

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 921–927

Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch Messung bzw. Schätzung des pH-Abfalls in einer Triolein-Emulsion

Von M. Hockeborn und W. Rick

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 2. März/9. August 1982)

Zusammenfassung: Bei der enzymatischen Hydrolyse von Triolein durch die Lipase im Serum entstehen Wasserstoffionen, die zu einem pH-Abfall im Testansatz führen. Das Ausmaß der pH-Änderung ist abhängig von der katalytischen Aktivität der Lipase und von der Pufferkapazität des Testsystems. In dem beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum dient der potentiometrisch gemessene und registrierte pH-Abfall als Meßgröße. Vergleichsuntersuchungen ergaben eine befriedigende Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Resultaten des kontinuierlichen titrimetrischen Tests. Weitere Untersuchungen wurden mit einer Modifikation des von Härtel et al. ((1971), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 396–397) beschriebenen Suchtests ausgeführt, der auf der Schätzung des pH-Abfalls mittels Farbänderung eines Indikators beruht. Bei ausreichender Erfahrung des Untersuchers ist auch dieser Test zur reproduzierbaren Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum geeignet.

Determination of the catalytic activity of lipase in serum by measurement or estimation of the pH decrease in a triolein emulsion

Summary: In the enzymic hydrolysis of triolein by lipase in serum, hydrogen ions are produced which lead to a decrease in the pH of the test system. The extent of this pH change depends on the catalytic activity of the lipase and on the buffering capacity of the test system. In the method described for the determination of the catalytic activity of lipase in serum, the decrease in pH is measured and recorded potentiometrically. Comparative studies showed a satisfactory correlation of results with those from the continuous titrimetric method. Further studies were performed with a modification of the detection method described by Härtel et al. ((1971) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 396–397), based on the estimation of the pH decrease from the colour change of an indicator. With operator experience, this test also gives reproducible results for the catalytic activity of lipase in serum.

Einführung

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Pankreaslipase (Triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) im kontinuierlichen titrimetrischen Test (2) sind ein pH-Meter, eine Motorbürette und ein empfindliches Regelgerät, das eine Konstanzhaltung des pH-Werts im Testansatz in einem Bereich von $\pm 0,001$ pH-Einheiten gestattet, erforderlich. Da die enzymatische Hydrolyse des als Substrat verwendeten Trioleins unter den beschriebenen Bedingungen ein relativ breites pH-Optimum aufweist, ist es auch möglich, die Lipaseaktivität im Serum ohne Titrationseinrichtung aufgrund der pH-Änderung, die im Testsystem durch die freigesetzten Wasserstoffionen bewirkt wird, zu ermitteln. Eine quantitative Aussage ist durch kontinuierliche Messung des pH-Abfalls zwischen pH 9,0 und 8,5 möglich. Zum anderen kann die Lipaseaktivität zwischen pH-Werten von etwa 8,3 und 7,4 an der Farbänderung eines Indikators (*m*-Kresolpurpur) durch Vergleich mit einer empirisch erstellten Farbskala abgeschätzt werden (1).

Material

Kontinuierliche Registrierung des pH-Abfalls

Reagentien

Zu den Untersuchungen wurden die für den kontinuierlichen titrimetrischen Test verwendeten und bereits 1969, 1976 bzw. 1982 beschriebenen Reagentien verwendet (2, 3, 4):

1. Gummi arabicum-Lösung, 100 g/l in bidest. Wasser (2).
2. Triolein-Emulsion, 0,2 l/l in Lösung 1 (2), pH-Wert mit Natronlauge auf etwa 9,4 einstellen.
3. Natriumglykocholatlösung, 75 mmol/l in bidest. Wasser (3).
4. Natronlauge, 100 mmol/l.
5. Salzsäure, 100 mmol/l.
6. Präzisionspuffer Radiometer S 1510, bei 25 °C pH 7,410.
7. Präzisionspuffer Radiometer S 1500, bei 25 °C pH 6,865.
8. Phosphatpuffer-Lösung, pH 6,88, 25 mmol/l, Merck 7254.
9. Acetatpuffer-Lösung, pH 4,66, 100 mmol/l, Merck 7827.
10. Stickstoff, frei von Kohlendioxid.

Meßanordnung

1. Digital-pH-Meter PHM 64, Radiometer Deutschland.
2. Elektronischer Schreiber Servograph REC 80 mit Titrigraph-Modul REA 160, Radiometer Deutschland.
3. Glaselektrode G 202 C, Kalomelelektrode K 4112, Radiometer Deutschland.
4. Kunststoffspitze zur Stickstoffzufuhr, Radiometer Deutschland.
5. Halterung der Elektroden und Kunststoffspitze durch den Elektrodenkopf der Mikro-Titrationseinrichtung TTA 31, Radiometer Deutschland.
6. Magnetrührer und Magnetstäbchen (etwa 25 mm Länge und 9 mm Durchmesser).
7. 25 ml-Bechergläser mit passendem Temperiermantel aus Kupfer, der mittels Thermostat auf 25 °C gehalten wird.

Probenmaterial

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um:

Seren von Gesunden,

Seren von Patienten mit akuten oder chronischen Pankreaserkrankungen,

Seren, in denen die Pankreaslipase durch zweistündige Inkubation bei 56 °C vollständig inaktiviert worden war, wie im kontinuierlichen titrimetrischen Test mit Triolein als Substrat nachgewiesen wurde,

Kontrollseren.

Schätzung des pH-Abfalls**Reagentien**

11. *m*-Kresolpurpur-Lösung, 12,5 g/l in 50 mmol/l Natronlauge. Da der Farbton der Substanz sich von Charge zu Charge geringfügig unterscheiden kann, empfiehlt es sich, die Indikatorlösung aus der Testpackung Merckognost Lipase (Merck 11000) zu benutzen. Die darin enthaltene Farblösung wird nach Angaben des Herstellers (5) jeweils auf ausreichende Übereinstimmung mit der beigelegten Skala geprüft.

12. Indikator- und Gallensalz-haltige Triolein-Emulsion: 100 ml Triolein-Emulsion (Reagens 2), 10 ml Indikatorlösung (Reagens 11) und 1,2 ml Natriumglykocholatlösung (Reagens 3) werden gemischt.

Die Substratemulsion muß eine violett-rötliche Farbe zeigen, bei zu intensiver Violettfrärbung bzw. Braun- bis Gelbfärbung ist der erforderliche Farbton durch Zugabe kleiner Volumina Salzsäure oder Natronlauge einzustellen.

Probenmaterial

s.o.

Methodik**Kontinuierliche Registrierung des pH-Abfalls****Prinzip**

Die bei der enzymatischen Hydrolyse von Triolein entstehenden Wasserstoffionen führen in dem schwach gepufferten Testsystem zu einem pH-Abfall, der zwischen pH 9,0 und 8,5 mittels pH-Meter und angeschlossenem Registriergerät aufgezeichnet wird.

Ausführung

Zur Kalibrierung des pH-Meters werden die unter Reagentien 6–9 aufgeführten und auf 25 °C temperierten Pufferlösungen verwendet. Die Schreiberspreizung wird auf pH 8,4–9,1 (= 25 cm) eingestellt, der Papiervorschub erfolgt mit 1 cm/min, bei sehr hohen katalytischen Aktivitäten mit 6 cm/min.

Die Meßtemperatur beträgt 25 °C.

Zur Ausführung der Bestimmungen mischt man in 25 ml-Bechergläsern: 10,0 ml Triolein-Emulsion (Reagens 2), ca. pH 9,4, 3,85 ml bidest. Wasser, 150 µl Natriumglykocholatlösung (Reagens 3), nach Temperierung auf 25 °C wird 1,0 ml Serum (bzw. Serumverdünnung in inaktiviertem Sammelserum) zugesetzt.

Um Störungen durch das Kohlendioxid der Raumluft zu vermeiden, durchströmt man den Raum über dem Testansatz mit Kohlendioxid-freiem Stickstoff.

Der pH-Wert des Ansatzes soll etwa 9,1 betragen, bei größeren Abweichungen ist das pH durch Zugabe geringer Volumina 100 mmol/l Natronlauge bzw. Salzsäure in diesen Bereich zu bringen. Ist der pH-Wert auf etwa 9,0 abgefallen, beginnt man mit der Registrierung. Je nach katalytischer Aktivität der Lipase des Serums ist die Änderung des pH-Wertes im Testansatz etwa 5–20 min lang aufzuzeichnen.

Da die Berechnung der katalytischen Aktivität des Enzyms im analysierten Serum über die Pufferkapazität der Reaktionsmischung erfolgt, empfiehlt es sich, die pH-Änderung im Bereich zwischen pH 9,0 und 8,5 nach Zugabe eines definierten Volumens Salzsäure (100 mmol/l) zu messen bzw. zu registrieren (s. Ergebnisse).

Auswertung

Zwischen pH-Werten von 9,0 und 8,5 erfolgt die Zunahme der Wasserstoffionen-Konzentration im Testansatz geradlinig. Aus dem registrierten pH-Abfall wird durch Parallelverschiebung das durchschnittliche ΔpH/min ermittelt.

Berechnung

Aufgrund der Pufferkapazität eines Testansatzes, der 1,0 ml inaktiviertes Sammelserum enthält (= $1,60 \pm 0,05 \mu\text{mol H}^+$ für ein ΔpH von 0,100) wird die katalytische Aktivität der Lipase in Seren wie folgt berechnet:

$$\text{Katalytische Aktivität} = \Delta\text{pH}/\text{min} \cdot 16000 \text{ (U/l (25 °C))}$$

Schätzung des pH-Abfalls**Prinzip**

Versetzt man die Triolein-Emulsion mit *m*-Kresolpurpur-Lösung, so kann der nach Serumzugabe durch die entstehenden Wasserstoffionen bedingte pH-Abfall an der Farbänderung des Indikators zwischen pH-Werten von etwa 8,3 bis 7,4 verfolgt und somit die katalytische Aktivität der Lipase im Serum abgeschätzt werden.

Ausführung

In Einmälröhrchen werden pipettiert:

2,0 ml Indikator- und Gallensalz-haltige Triolein-Emulsion + 200 µl Serum,

die Ansätze sind mittels Vortex- oder Whirl-Mix o.ä. sorgfältig zu mischen. Weicht die Farbe einzelner Bestimmungsansätze aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte der Seren von dem mit „Null bis 60“ bezeichneten Bereich ab, so wird die Färbung durch Zugabe sehr geringer Volumina 100 mmol/l Säure oder Lauge in den genannten Skalenabschnitt gebracht. Die Röhrchen werden in einem Wasserbad bei 25 °C inkubiert.

Einige Minuten nach Mischen der Ansätze vergleicht man deren Farbton mit der kalibrierten Farbskala und notiert den entsprechenden Wert. Die Ablesung wird bei Seren mit geringer katalytischer Aktivität nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wiederholt. Bei hochaktiven Proben wird in kürzeren Abständen – evtl. minutenweise – ausgewertet.

Da der Testansatz an der Oberfläche durch das Kohlendioxid der Raumluft in Richtung gelber Farbtöne verändert wird, ist ein Umschütteln der Röhrchen während der Inkubation und Ablesung streng zu vermeiden, da dies zu fälschlich erhöhten Aktivitäten führt.

Berechnung

Bei korrekter Ausführung ergeben sich unter Berücksichtigung der nur stufenweise (20 U/l) möglichen Auswertung annähernd konstante Differenzwerte zwischen den Ablesungen zu den genannten Zeiten (s. Abb. 1). Die Farbskala ist für eine Inkubationszeit von 2 Stunden ausgelegt. Die ermittelte Differenz zwischen dem Farbvergleich zur Zeit $t = 0$ min und demjenigen zur Zeit $t = 120$ min entspricht der katalytischen Aktivität der Lipase im untersuchten Serum in U/l (25°C).

Hochaktive Seren führen zu einer schnellen Änderung der Farbe des Indikators und erfordern somit eine Ablesung in kurzen Zeitabständen. Dementsprechend muß eine Korrektur auf eine Inkubationszeit von 2 Stunden erfolgen.

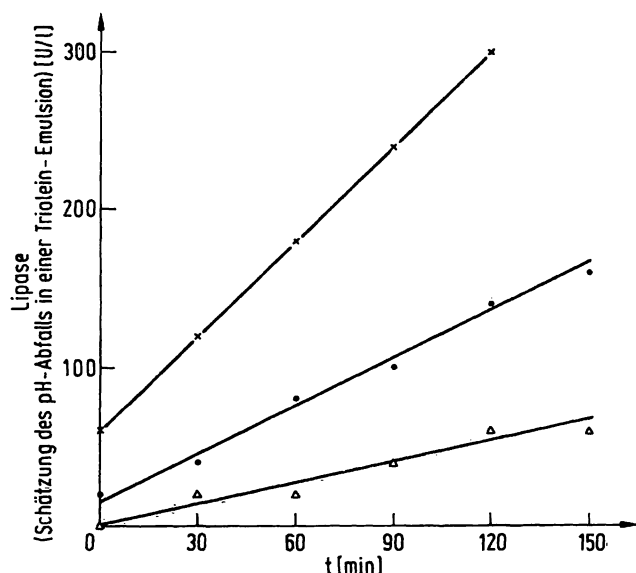


Abb. 1. Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch Schätzung des pH-Abfalls (modif. nach Härtel et al. (1)).

Ablesungen an der Farbskala nach unterschiedlich langer Inkubation des Testansatzes.

- △—△ Serum Nr. 105
- Serum Nr. 12
- ×—× Serum Nr. 22

Ergebnisse

Kontinuierliche Registrierung des pH-Abfalls

Reagentien-Leerwert

Unter den beschriebenen Bedingungen, d.h. bei Verdrängung des Kohlendioxids der Raumluft über dem Testansatz durch Stickstoffzufuhr, fanden wir sowohl in Abwesenheit als auch nach Zusatz von inaktiviertem Sammelserum keine pH-Änderung in der Reaktionsmischung. Wird mit einem zu großen Volumen N_2 durchströmt, kommt es infolge der Austreibung von CO_2 aus dem Testansatz zu einem geringfügigen Anstieg des pH-Wertes. Die erforderliche optimale Stickstoffzufuhr ist daher an Leerwerten zu kontrollieren.

Testbedingungen

Wir führten die Messungen unter den in früheren Arbeiten als optimal ermittelten Konzentrationen der Reak-

tionspartner aus (4). Versuche, die Empfindlichkeit des Verfahrens dadurch zu steigern, daß die Konzentration an Gummi arabicum in der Substratemulsion auf 50 bzw. 20 g/l herabgesetzt wurde, schlugen fehl. Zum einen ergaben sich aufgrund der verminderten Pufferung stärkere Schwankungen in der pH-Anzeige und damit der Registrierung, andererseits kam es bei Konzentrationen an Gummi arabicum unter 50 g/l zu einer Entmischung der Substratemulsion. Setzt man Serum mit einer katalytischen Aktivität der Lipase von 60 U/l in den hier beschriebenen Test ein, so findet man ein ΔpH von 0,0375/10 min. Eine Probe mit 160 U/l (obere Grenze des Normbereichs) ergibt ein ΔpH von 0,100/10 min. Somit ist die Empfindlichkeit des Verfahrens als ausreichend zu bezeichnen.

Reaktionsablauf

Der pH-Abfall im Testansatz erfolgt – unabhängig von der eingesetzten katalytischen Aktivität – zwischen pH-Werten von 9,0 und 8,5 geradlinig. Als Beispiel ist der Verlauf bei Einsatz eines Serums mit einer katalytischen Aktivität von 1500 U/l dargestellt (Abb. 2).

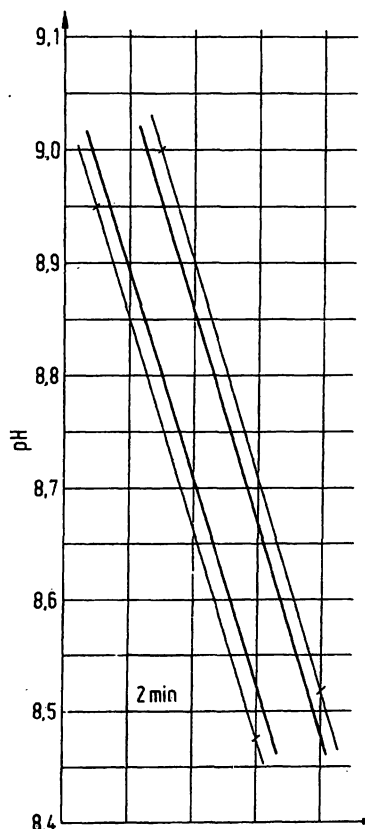


Abb. 2. Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch potentiometrische Messung des pH-Abfalls im Testansatz. Reaktionsablauf in Abhängigkeit von der Zeit. Einsatz eines Serums mit $\bar{x} = 1500$ U/l (kontinuierlicher titrimetrischer Test). Auswertung der Registrierungen (Doppelbestimmung) mittels Parallelverschiebung und Berechnung des $\Delta\text{pH}/5$ min; gefundene katalytische Aktivität = 1540, 1515 U/l.

Pufferkapazität des Testansatzes

Durch Zugabe von Salzsäure (100 mmol/l) zu Testen, die 1,0 ml inaktiviertes Sammelserum enthielten, wurde die Pufferkapazität im Ansatz ermittelt. Für einen pH-Abfall um 0,100 waren im Meßbereich zwischen pH 9,0 und 8,5 $1,60 \pm 0,05$ μmol Wasserstoffionen erforderlich. Aus diesen Ergebnissen wurde der oben angegebene Berechnungsfaktor ermittelt.

Durch getrennte Titration von Serum und von Substrat-emulsion konnte nachgewiesen werden, daß die Pufferkapazität des Testansatzes zu etwa gleichen Teilen durch Serum und Substrat bedingt ist (s. Diskussion).

Die Puffereigenschaften des Systems bei Einsatz verschiedener Serumproben lassen sich im einzelnen Test dadurch prüfen, daß die pH-Änderung im zur Messung verwendeten pH-Bereich durch Zusatz von 2 μmol Wasserstoffionen in Form von Salzsäure (100 mmol/l) gemessen wird. Sie betrug bei 18 untersuchten Seren, deren Proteingehalt zwischen 60 und 80 g/l lag, $0,125 \pm 0,010$.

Abhängigkeit des Meßsignals von der eingesetzten katalytischen Aktivität

Seren mit unterschiedlich hoher katalytischer Aktivität wurden mit inaktiviertem Sammelserum im Verhältnis 1 + 9, 1 + 4 bzw. 1 + 1 verdünnt; 1,0 ml der Verdünnungen wurde in den Test eingesetzt.

Unter den beschriebenen Bedingungen ergab sich eine geradlinige Beziehung zwischen Enzymmenge im Test und pH-Abfall pro Zeiteinheit (Abb. 3). Da die Pufferkapazität des Testansatzes etwa konstant gehalten wer-

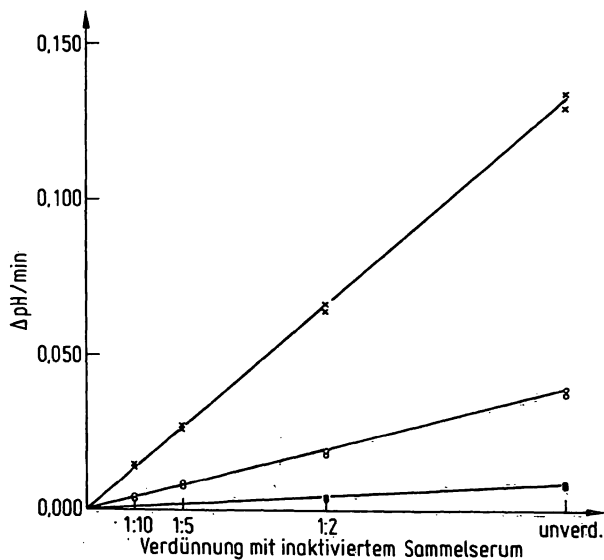


Abb. 3. Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch potentiometrische Messung des pH-Abfalls im Testansatz.

Abhängigkeit des Meßsignals von der eingesetzten Enzymaktivität.

Gefundene katalytische Aktivitäten:

- ×—× 2130 U/l (Titration \bar{x} = 2000 U/l)
- 632 U/l (Titration \bar{x} = 660 U/l)
- 144 U/l (Titration \bar{x} = 133 U/l)

den muß, ist es selbstverständlich, daß eine Verdünnung des Serums mit physiologischer NaCl-Lösung je nach Volumenverhältnis zu große pH-Änderungen in der Zeiteinheit und somit fälschlich erhöhte katalytische Aktivitäten bewirkt.

Vergleichsuntersuchungen mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test

An 72 Seren mit einer katalytischen Aktivität an Lipase zwischen 60 und 2100 U/l im Titrationsverfahren wurde die hier beschriebene Methode vergleichend geprüft (Abb. 4). Die Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation ($r = 0,990$). Die Gleichung der Regressionsgeraden lautete $y = 1,04 x - 17,7$. Im Wilcoxon-Test ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Stichproben. Beide Methoden erlauben mithin gleiche diagnostische Aussagen.

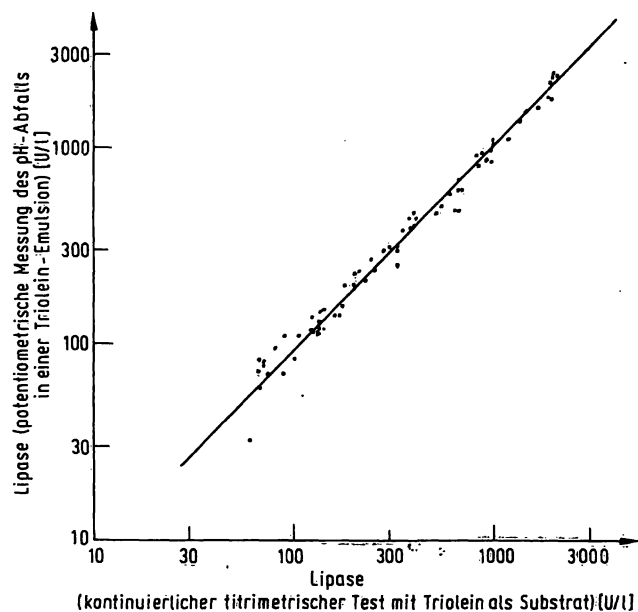


Abb. 4. Vergleich des potentiometrischen Verfahrens mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test an 72 Seren mit einer katalytischen Aktivität an Lipase zwischen 60 und 2100 U/l.

$$y = 1,04 x - 17,7$$

$$r = 0,990$$

Präzision der potentiometrischen Messung

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag betrug bei katalytischen Aktivitäten im Bereich um 400 U/l $VK = 5,9\%$.

Schätzung des pH-Abfalls

Hinweise zur Auswertung

Die Schätzung des pH-Abfalls mit Hilfe der von Härtel et al. (1) angegebenen Farbskala führt bei ausreichender Übung des Untersuchers zu reproduzierbaren Ergebnissen. Um zwischen den geringen Farbunterschieden differenzieren zu können, empfiehlt es sich, zunächst Proben mit bekannter katalytischer Aktivität der Lipase (z. B. Kontrollseren) zu analysieren und sich durch häufiges Ablesen in die Farbabstufungen „einzusehen“.

Untersuchung hochaktiver Seren

Bei stark erhöhten katalytischen Aktivitäten an Lipase (bis etwa 5000 U/l) ist es möglich, in Minutenabständen abzulesen. Durch Umrechnung entsprechend der Inkubationszeit sind mit diesem Vorgehen zuverlässige Resultate zu erzielen (Abb. 5). Bei extrem hohen katalytischen Aktivitäten sollten die Proben mit inaktiviertem Sammelserum verdünnt in den Test eingesetzt werden. Hierdurch ist eine lineare Beziehung zwischen verwendetem Probenvolumen und Lipase gewährleistet (Abb. 6).

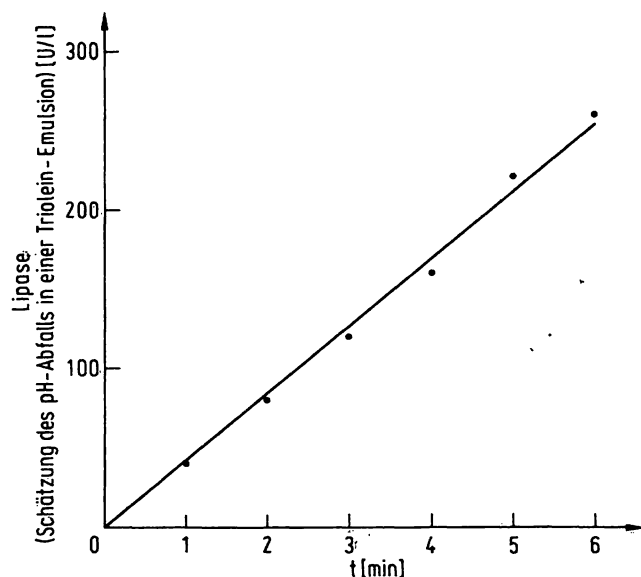


Abb. 5. Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch Schätzung des pH-Abfalls (modif. nach Härtel et al. (1)).

Ablesungen an der Farbskala nach unterschiedlich langer Inkubation des Testansatzes.

Gefundene katalytische Aktivität:

5600 U/l (Titration $\bar{x} = 6000$ U/l)

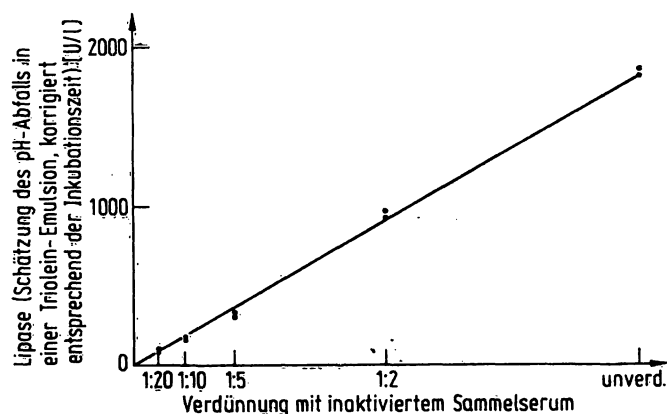


Abb. 6. Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipase im Serum durch Schätzung des pH-Abfalls (modif. nach Härtel et al. (1)).

Einsatz verschiedener Verdünnungen eines hochaktiven Serums (Aktivität im kontinuierlichen titrimetrischen Test 2000 U/l) mit inaktiviertem Sammelserum.

Ablesungen nach unterschiedlich langer Inkubation bei 25 °C.

Gefundene katalytische Aktivität:

1930 U/l

Vergleichsuntersuchungen mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test

An 90 Seren mit katalytischen Aktivitäten bis zu 150 U/l ($\bar{x} = 83$ U/l) ergab sich eine Korrelation von $r = 0,816$, die Regressionsgleichung lautete $y = 0,73 x + 22,4$ (Abb. 7). 36 Seren mit erhöhter Lipase ($\bar{x} = 261$ U/l) zeigten eine Korrelation von $r = 0,987$ und eine Regressionsgerade von $y = 1,03 x - 16,0$ (Abb. 8). Im Wilcoxon-Test fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stichproben.

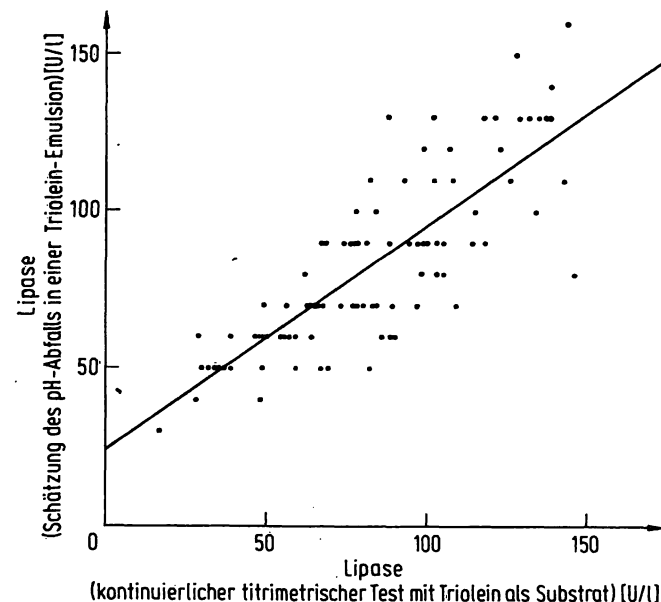


Abb. 7. Vergleich des Verfahrens auf Grund der Schätzung des pH-Abfalls mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test an 90 Seren mit einer katalytischen Aktivität an Lipase bis zu 150 U/l.

$$y = 0,73 x + 22,4$$

$$r = 0,816$$

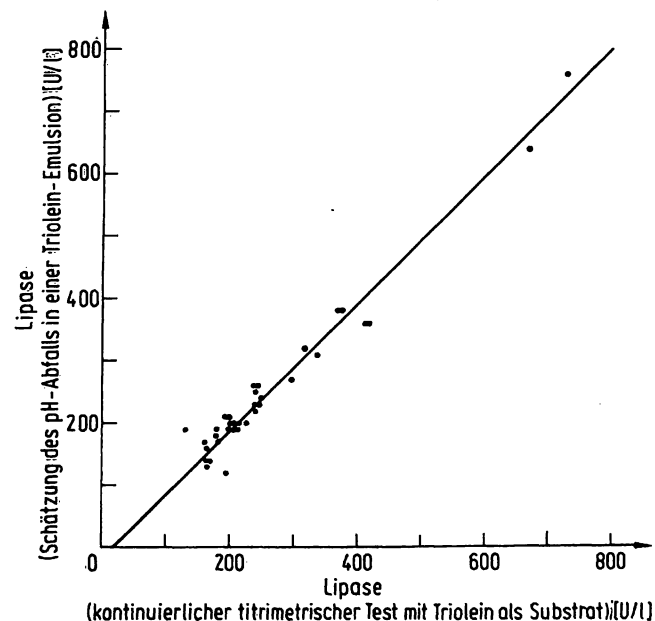


Abb. 8. Vergleich des Verfahrens auf Grund der Schätzung des pH-Abfalls mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test an 36 Seren mit erhöhter katalytischer Aktivität an Lipase ($\bar{x} = 261$ U/l).

$$y = 1,03 x - 16,0$$

$$r = 0,987$$

Präzision des Verfahrens

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag betrug bei katalytischen Aktivitäten um 300 U/l VK = 6,3%.

Diskussion

Kontinuierliche Registrierung des pH-Abfalls

Die Ausführung des kontinuierlichen titrimetrischen Tests zur Bestimmung der Lipase (2, 3, 4) erfordert viel experimentelles Geschick und eine aufwendige apparative Ausrüstung. Wegen der häufig ungezielten Anordnung von Untersuchungen dürfte es kaum möglich sein, alle anfallenden Proben mit diesem Verfahren zu analysieren.

Durch die hohe Empfindlichkeit der modernen digitalen pH-Meter ist es heute möglich, geringe pH-Änderungen reproduzierbar zu messen. Mit diesen Geräten kann die katalytische Aktivität der Lipase des Serums auch dadurch ermittelt werden, daß der pH-Abfall in einem dem titrimetrischen Test entsprechenden Ansatz zwischen pH 9,0 und 8,5 kontinuierlich gemessen und registriert wird. Steht kein Schreiber zur Verfügung, so können die pH-Änderungen des Ansatzes in bestimmten Zeitintervallen mit der Stoppuhr abgelesen werden. Wichtige experimentelle Einzelheiten zu einem derartigen Verfahren wurden von *Chance & Nishimura* (6) mitgeteilt. Die Berechnung der katalytischen Aktivität des Enzyms erfolgt nach Angaben der Autoren über die gemessene Pufferkapazität des Testsystems. Die Pufferung des gesamten Ansatzes bei Zusatz von inaktiviertem Sammelserum errechnete sich nach unseren Untersuchungen zu $1,60 \pm 0,05 \mu\text{mol H}^+$ pro ΔpH von 0,100 (Meßbereich pH 9,0–8,5). Die von uns an Sammelserum ermittelte Pufferkapazität betrug $0,75 \pm 0,02 \mu\text{mol Wasserstoffionen}$ für einen pH-Abfall von 0,100 und stimmt mit den Daten von *Winters & Dell* (7) gut überein. Diese Autoren fanden ein $\Delta[\text{H}^+]$ von $0,74 \mu\text{mol}$ für ein ΔpH von 0,100, wobei ein Hämatokrit von 0,45 l/l angenommen wurde. Prüften wir die Pufferkapazität der reinen Substratemulsion, ergaben sich Werte von $0,85 \pm 0,008 \mu\text{mol H}^+$ für den genannten pH-Abfall. Der Anteil des Serums an der Gesamtpufferkapazität beträgt somit 47%, derjenige der Substratemulsion 53%.

Die Pufferkapazität des einzelnen Ansatzes wird dadurch prüfbar, daß der pH-Abfall im Testansatz nach Zugabe von $2 \mu\text{mol}$ Salzsäure gemessen wird. Eine veränderte Pufferkapazität aufgrund erheblich abweichender Proteinkonzentration in dem zu analysierenden Serum kann mit diesem – der Verwendung eines „internen Standards“ analogen – Verfahren erkannt und evtl. korrigiert werden. Sind Proteingehalt der Probe bzw. Pufferkapazität des gesamten Ansatzes nicht bekannt, so können keine exakten Ergebnisse erwartet werden.

Die enzymatische Hydrolyse des Trioleins zeigt zwischen pH 9,0 und 8,5 ein Plateau (4). Auch der gemessene pH-Abfall verläuft in dem genannten Bereich aufgrund

der Puffercharakteristik der Substratemulsion und der Serumproteine geradlinig. Als Ursache dieser linearen Pufferung wird in bezug auf die Proteine die Überlagerung von Komponenten mit unterschiedlichen pK-Werten angenommen (7); der gleiche Mechanismus ist für die Makromoleküle zu diskutieren, aus denen Gummi arabicum zusammengesetzt ist.

Vergleichsuntersuchungen mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test ergaben eine befriedigende Übereinstimmung. Mithin stellt das hier beschriebene Verfahren eine Alternative für diejenigen Laboratorien dar, die nicht über die Mittel zur Beschaffung der für die pH-Stat-Technik notwendigen Titrationsanlage verfügen. Im Einzelfall sind die diskutierten Fehlerquellen durch unterschiedlichen Proteingehalt der Seren zu berücksichtigen. Der Zeitaufwand bei der technischen Ausführung ist gegenüber dem Titrationsverfahren nur geringfügig reduziert. Die Notwendigkeit, hochaktive Proben mit inaktiviertem Sammelserum zu verdünnen und die Tatsache, daß nur Serum analysiert werden kann, bedeuten einen Nachteil gegenüber dem titrimetrischen Test.

Schätzung des pH-Abfalls

Der pH-Abfall einer mit Serum versetzten Olivenölemulsion stellt auch die Grundlage des von *Härtel et al.* (1) beschriebenen Suchtests dar. Dabei wird die Farbänderung von *m*-Kresolpurpur, dessen pK-Wert bei 8,32 liegt, im pH-Bereich zwischen etwa 8,3 und 7,4 ermittelt. Die Kalibrierung der von *Härtel et al.* (1) angegebenen Farbskala erfolgte mit Seren, deren katalytische Aktivität im titrimetrischen Test bestimmt wurde. Dem geübten Untersucher ist es möglich, mit dem Verfahren zu reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die hier beschriebenen Untersuchungen mit der auch im titrimetrischen Test verwendeten Triolein-Emulsion in Anwesenheit von Natriumglykocholat ausgeführt wurden. Die von uns verwendete Indikator-haltige Substratemulsion enthält – abweichend von der Vorschrift nach *Härtel et al.* (1) – Natriumglykocholat in einer Konzentration von 0,83 mmol/l. Nach Serumzugabe entspricht die Gallensalzkonzentration mit 0,75 mmol/l derjenigen im kontinuierlichen titrimetrischen Test (4). Die Substratkonzentration liegt mit 0,177 l/l höher als beim Titrationsverfahren (0,133 l/l) (3). Die größere Viskosität des Ansatzes ist für den Farbtest deshalb günstig, da das Schütteln erschwert ist und somit der durch das Kohlendioxid der Raumluft bedingte pH-Abfall in einer 2–3 mm dicken Schicht an der Oberfläche des Ansatzes bei vorsichtiger Handhabung keine Fehlerquelle darstellt. Die enzymatische Hydrolyse des Trioleins erfolgt, wie im kontinuierlichen titrimetrischen Test gezeigt werden konnte (4), bei beiden Substratkonzentrationen praktisch mit gleicher Geschwindigkeit. Zur Brauchbarkeit verschiedener Chargen der Olivenölemulsion aus der Testpackung Merckognost Lipase kann von uns nicht Stellung genommen werden.

Bei der Bewertung der von Härtel et al. (1) angegebenen Analytik ist zu berücksichtigen, daß das Verfahren als Suchtest beschrieben wurde. Es erlaubt nur in Stufen von 20 U/l abzulesen; bei der Durchführung von Doppelbestimmungen ist eine Differenzierung bis zu 10 U/l möglich. Bei verkürzter Inkubationszeit können auch sehr hohe katalytische Aktivitäten bestimmt werden.

Wie bei der potentiometrischen Messung des pH-Abfalls stellt eine stark abweichende Proteinkonzentration der Probe eine Fehlerquelle dar. Weiterhin können nur farb-tüchtige Untersucher mit der Ausführung des Verfahrens betraut werden.

In Vergleichsuntersuchungen mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test wurde eine für diagnostische Zwecke ausreichende Übereinstimmung festgestellt. Bei niedrigen katalytischen Aktivitäten sind der pH-Abfall und somit die Farbänderung des Ansatzes nur sehr gering, so daß bei einer nur stufenweise möglichen Abschätzung im Einzelfall relativ große Differenzen zu dem Titrationsverfahren unvermeidbar sind. An 59 Seren mit einer katalytischen Aktivität von unter 100 U/l wurden mit dem Suchtest jedoch ausschließlich Ergebnisse ermittelt, die im Normbereich (bis 160 U/l) lagen, so daß auch diese

niedrigen Aktivitäten zuverlässig einzuordnen sind. Die größten Abweichungen betragen bei Werten von 67 bzw. 82 U/l im titrimetrischen Test + 23 bzw. - 32 U/l. Höhere Lipaseaktivitäten führen zu einer stärkeren Farbänderung mit der Zeiteinheit, somit wird die bessere Korrelation bei Seren mit Werten oberhalb des Normbereichs verständlich.

Trotz der durch langjährige Übung erzielten guten Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Titration kann der Test keinesfalls — wie kürzlich beschrieben (8) — als Referenzmethode für andere Verfahren dienen. Neben der Anwendung im Bereitschaftsdienst — hier liegt ohne apparativen Aufwand innerhalb kurzer Zeit ein diagnostischer Hinweis vor — ist der Test vor allem dazu geeignet, Seren mit im Normbereich liegender Lipase sicher zu erkennen. In diesen Fällen ist es vertretbar, als Befund „Lipaseaktivität im Normbereich“ mitzuteilen. Wenn anschließend nur die als sicher oder fraglich pathologisch identifizierten Seren im kontinuierlichen titrimetrischen Test analysiert werden, hält sich der Arbeitsaufwand in vertretbaren Grenzen. Beim Einsatz der beiden genannten Lipase-Bestimmungsverfahren ist die Zuverlässigkeit der Ergebnisse gesichert.

Literatur

1. Härtel, A., Banauch, D. & Helger, R. (1971) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 396–397.
2. Rick, W. (1976) Lipase. In: Handbuch der Inneren Medizin (Forell, M. M. ed.). 5. Aufl. Bd. III/6: Pankreas. Springer, Berlin pp. 350–361.
3. Rick, W. (1969) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 530–539.
4. Hockeborn, M. & Rick, W. (1982) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 773–785.
5. Helger, R. (1982) persönliche Mitteilung.
6. Chance, B. & Nishimura, M. (1967) Sensitive Measurements of Changes of Hydrogen Ion Concentration. In: Methods in Enzymology (Estabrook, R. W. & Pullman, M. E. eds.). Vol. X. Academic Press, New York pp. 641–650.
7. Winters, R. W. & Dell, R. B. (1965) Regulation of Acid-Base Equilibrium. In: Physiological Controls and Regulations (Yamamoto, W. S. & Brobeck, J. R. eds.). Saunders, London pp. 181–238.
8. Lorentz, K. & Flatter, B. (1980) Med. Lab. 33, 236–239.

Prof. Dr. W. Rick
Institut für Klinische Chemie
und Laboratoriumsdiagnostik
der Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5
D-4000 Düsseldorf

